

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **06-306100**

(43)Date of publication of application : **01.11.1994**

(51)Int.Cl.

C07K 15/12
 C07K 7/10
 C07K 15/04
 C12N 1/21
 C12N 15/16
 C12P 21/02
 //(C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12P 21/02
 C12R 1:19)
 C07K 99:00

(21)Application number : **05-099313**

(71)Applicant : **SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO LTD**

(22)Date of filing : **26.04.1993**

(72)Inventor : **TAKAHASHI HARUO
 KOBAYASHI YOHEI
 NAGOSHI MASANAO
 MITANI TAKAHIKO
 HIRAIDE KINYA
 SAWAI KIICHI**

(54) FUSED PROTEIN FOR PREPARING VIP ANALOG, PRODUCTION OF VIP ANALOG, GENE RECOMBINATION PLASMID THEREFOR AND TRANSFORMANT MICROORGANISM

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare a large amount of VIP analog having excellent biological activity and stability by gene recombination.

CONSTITUTION: A manifesting plasmid is integrated with DNA encoding a polypeptide comprising a site having $\leq 5,000$ molecular weight, which is part of sarcophagalectin, as a leader peptide and one or plural molecules of a peptide of general formula His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-thr-R1-R2-Tyr-Thr-R3Leu-Arg-Lys- Gln-Leu-Ala-Rq-R5-Lys-Tyr-Leu-R5-R7-R3-Rjg-Met (for example, R) is Asp, R2 is Asn, R3 is Arg, R4 is Val, R5 is Lys, R6 is Asn, R7 is Ser, R8 Ile, R9 is Leu and R10 is Asn) randomly linked in tandem to the downstream of the leader peptide, Escherichia coli is transformed, the transformed bacteria are cultured to manifest a large amount of fused protein as a polypeptide, the fused protein is treated with cyanogen bromide to give VIP analog (amino acid residue of C end is homoserine or homoserine.lactone residue caused by change of Met).

(19)日本特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-306100

(43)公開日 平成6年(1994)11月1日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/12		8318-4H		
7/10	Z N A	8318-4H		
15/04		8318-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
		9060-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願平5-99313			(71)出願人 090144577
(22)出願日	平成5年(1993)4月26日			株式会社三和化学研究所 愛知県名古屋市東区東外堀町35番地
			(72)発明者 高橋 治雄	名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研究所内
			(72)発明者 小林 洋平	名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研究所内
			(72)発明者 名越 正直	名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三和化学研究所内
			(74)代理人 弁理士 佐々木 功 (外1名)	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 V I P アナログ調製用融合蛋白、V I P アナログの製法並びにそのための遺伝子組換えプラスミド及び形質転換微生物

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 生物学的活性と安定性に優れた VIP アナログを遺伝子組換え技術により大量調製する方法を提供する。

【構成】 ガルコファージレクチンの一部であって分子量 5000 以上の部位をリーダーペプチドとし、リーダーペプチド下流に一般式 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-R₁-R₂-Tyr-Thr-R₃-Leu-Arg-Lys-Gln-Leu-Ala-R₄-R₅-Lys-Tyr-Leu-R₆-R₇-R₈-R₉-Met (例えば R₁ は Asp、R₂ は Asn、R₃ は Arg、R₄ は Val、R₅ は Lys、R₆ は Asn、R₇ は Ser、R₈ は Ile、R₉ は Leu、R₁₀ は Asn) のペプチドが単数又は複数分子タンデムに連結したポリペプチドをコードする DNA を発現用プラスミドに組み込み、大腸菌を形質転換させ、形質転換菌を培養して上記ポリペプチドを融合蛋白として大量に発現させ、融合蛋白を臭化シアンで処理して VIP アナログ (C 末端のアミノ酸残基は Met が変化したホモセリン又はホモセリン・ラクトン残基である) とする。

(2)

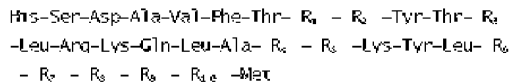
特開平6-306100

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ギャラクツァーガレクチンの一部であって分子量が5000以上の部位をリーダーペプチドとしており、該リーダーペプチドの下流に一般式(1)

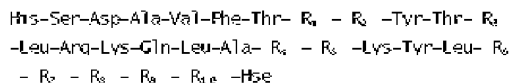


(式中 R_1 は Asp 又は Gly を意味し、 R_2 は Asn 又は Gln を意味し、 R_3 は Arg 又は Lys を意味し、 R_4 は Val, Ala 又は Lys を意味し、 R_5 は Lys 又は Leu を意味し、 R_6 は Asn, Gln 又は Lys を意味し、 R_7 は Ser, Lys 又は Ala を意味し、 R_8 は Ile, Ala 又は Leu を意味し、 R_9 は Leu 又は Lys を意味し、 R_{10} は Asn, Lys 又は Arg を意味する)にて示されるペプチドが単数又は複数分子タンデムに連結した状態をなしていることを特徴とする、VIP アナログ調製用融合蛋白。

【請求項2】 一般式(1)において、 R_1 が Gly であり、 R_2 が Asn であり、 R_3 が Lys であり、 R_4 が Ala であり、 R_5 が Lys であり、 R_6 が Asn 又は Lys であり、 R_7 が Lys 又は Ala であり、 R_8 が Ala 又は Leu であり、 R_9 が Leu 又は Lys であり、 R_{10} が Lys 又は Arg であることを特徴とする、請求項1に記載の VIP アナログ調製用融合蛋白。

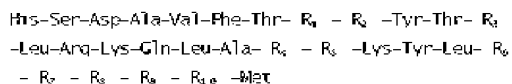
【請求項3】 リーダーペプチドに後続するペプチドがタンデムに4分子連結した状態であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の VIP アナログ調製用融合蛋白。

【請求項4】 請求項1に記載の融合蛋白を臭化シアンで処理することを特徴とする、一般式(2)



(式中 R_1 は Asp 又は Gly を意味し、 R_2 は Asn 又は Gln を意味し、 R_3 は Arg 又は Lys を意味し、 R_4 が Val, Ala 又は Lys を意味し、 R_5 は Lys 又は Leu を意味し、 R_6 は Asn, Gln 又は Lys を意味し、 R_7 は Ser, Lys 又は Ala を意味し、 R_8 は Ile, Ala 又は Leu を意味し、 R_9 は Leu 又は Lys を意味し、 R_{10} は Asn, Lys 又は Arg を意味し、Hse はホモセリン又はホモセリンラクトン残基を意味する)にて示される VIP アナログの製法。

【請求項5】 ギャラクツァーガレクチンの一部であって分子量が5000以上の部位をリーダーペプチドとしており、該リーダーペプチドの下流に一般式(1)



(式中 R_1 は Asp 又は Gly を意味し、 R_2 は Asn 又は Gln を意味し、 R_3 は Arg 又は Lys を意味し、 R_4 は Val, Ala 又は Lys を意味し、 R_5 は Lys 又は Leu を意味

し、 R_6 は Asn, Gln 又は Lys を意味し、 R_7 は Ser, Lys 又は Ala を意味し、 R_8 は Ile, Ala 又は Leu を意味し、 R_9 は Leu 又は Lys を意味し、 R_{10} は Asn, Lys 又は Arg を意味する)にて示されるペプチドが単数又は複数分子タンデムに連結した状態をなしているポリペプチドをコードする DNA を有していることを特徴とする、遺伝子組換えプラスミド。

【請求項6】 一般式(1)において、 R_1 が Gly であり、 R_2 が Asn であり、 R_3 が Lys であり、 R_4 が Ala であり、 R_5 が Lys であり、 R_6 が Asn 又は Lys であり、 R_7 が Lys 又は Ala であり、 R_8 が Ala 又は Leu であり、 R_9 が Leu 又は Lys であり、 R_{10} が Lys 又は Arg であることを特徴とする、請求項5に記載の遺伝子組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項5に記載のプラスミドを含有していることを特徴とする、形質転換微生物。

【請求項8】 形質転換されているのが E. coli JM109 又は HB101 株であることを特徴とする、請求項7に記載の形質転換微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は VIP アナログ調製用融合蛋白、VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) アナログの製法並びにそのための遺伝子組換えプラスミド及び形質転換微生物に係る。

【0002】

【従来の技術及びその課題】 平滑筋弛緩作用を有するポリペプチドは数多く発見されているが、VIP は Said 及び Mutt により 1970 年にブタ十二指腸からセクレチン抽出精製する過程で副分画から分離精製された 28 個のアミノ酸からなり、C 末端に NH_2 を有するペプチドホルモンである。VIP のアミノ酸の一次構造は 1974 年に明らかにされ、グルカゴンやセクレチン等と類似していることからグルカゴン・セクレチンファミリーに属するペプチドホルモンであるとされるに至っている。その後、VIP は消化管以外に神経系等にも存在が認められており、その生物学的作用は多彩であって強い血管拡張・血圧降下作用、平滑筋弛緩作用、膵液分泌促進作用、唾液・胆汁分泌促進作用、胃酸分泌抑制作用、グリコーゲン分解作用、種々の下垂体ホルモン分泌促進作用や生殖器官における血流調節作用、気管支拡張作用等を有することが明らかにされている。これらの種々多様な生物学的作用の中で、VIP の気管支平滑筋弛緩作用並びに海綿体小柱の血管拡張作用は気管支喘息やインポテンツの治療に応用できるものと期待されている。

【0003】 しかしながら、VIP を動物の臓器から分離抽出したり、化学合成により製造する場合には生産量、生産効率、純度、製造コスト等に関係がある。更に、VIP は物理化学的に不安定であるのみならず、生体内に存在する酵素によっても分解され易いと云う問題点を有し

(3)

特開平6-306100

3

4

ており、従って VIP を医薬品として実用化することは非常に困難であると考えられてきた。このような問題点を解決するために、VIP と同等以上の生物学的活性を有する VIP アナログや VIP よりも安定性に優れた VIP アナログに関する研究が活発に行われてきており、例えば以下に示すような研究成果報告が現在までになされている。

【0004】化学合成による VIP アナログとして、VIP の 17 位に存在するメチオニン残基をロイシン又はノルロイシン残基に変換したポリペプチドは VIP と同様な生物学的活性を有する (特開昭 62-246595)。VIP の N 末端又は C 末端のアミノ酸残基を 1 つ又は 2 つ欠落させると生物学的活性は大幅に減少するが ["J. Bio 1, Chen, ", Vol. 266, pages 6389 - 6392 (1991)], C 末端に短基性アミノ酸残基を付加した VIP アナログは 3-4 倍程度強い生物学的活性を示す (既述の特開昭 62-246595)。VIP の N 末端をアセチル化し、17 位のメチオニン残基をノルロイシン残基に変換した VIP アナログをリーディング化合物とし、更に数ヶ所のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に変換した VIP アナログは 10 優れた生物学的活性を示す (特開平 3-38609)。しかしながら、これらの化学合成による VIP アナログは、その構造中に天然には存在しない形のアミノ酸残基を包含していたり、N 末端がアセチル化されていたりするので、遺伝子組換え技術により製造することは事実上不可能である。

【0005】一方、遺伝子組換え技術による VIP アナログとしては、[Leu¹⁷]-VIP-OH (特開平 1-296996 及び同 3-280893)、[Leu¹⁷]-VIP-Gly、[Leu¹⁷]-VIP-Gly-Lys-Arg 等 (特開平 3-502880) 及び VIP-Gly (特開平 4-148694) が報告されている。これらの公開特許公報に開示されている方法に従い VIP を調製した場合、培地 1 リットル当たりの発現量は通例数百 µg であり、最高でも数 mg であって、商業的規模での生産を可能にするには発現量を更に高める必要がある。又、上記の公開特許公報に開示されている VIP アナログを生物学的活性の面からみると、[Leu¹⁷]-VIP-OH と VIP-Gly は天然型 VIP と同等程度であり、一方 [Leu¹⁷]-VIP-Gly は天然型 VIP の 70% 程度であって生物学的活性の増強は全く認められない。従って、公知の組換え技術による VIP アナログに関しては、生産効率及び生物学的活性の両面において問題があることになる。

【0006】このような従来技術の課題を克服するために、本発明者等は鋭意検討を重ね、遺伝子組換え技術を利用し且つ工業的大量生産に適し、然かも天然型 VIP と比較する場合にも生物学的活性が著しく増強した VIP アナログを見出して、これらに関する特許出願をなした (特開平 4-230400 及び特開平 5-9468)。本発明者等がこれらの特許出願において開示した VIP アナログに共通する構造上の特徴は、その C 末端に Hse (ホ

モセリン又はホモセリン-ラクトン残基) が付加されている点にある。これらの VIP アナログは、先ずその前駆体 (C 末端が Met) を複数個連結した融合蛋白として遺伝子組換え技術により大量発現させ、次いでこの融合蛋白を臭化シアンにて処理することにより得ることができる (臭化シアン処理により Met の部位で切断が生じるので、融合蛋白が個々のペプチドフラグメントに分離し且つ各フラグメントの C 末端における Met が上記の Hse に変換し、この場合にホモセリン残基となるか或はホモセリン-ラクトン残基となるか若しくはこれらの混合物となるかは pH 条件に依存する)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題乃至発明の目的】慣用技術によれば、VIP および公知の VIP アナログを工業的に大量生産することは困難であり、然かも VIP および公知の VIP アナログは生体内で不安定であり作用持続時間も短かく、従って生体に投与する場合には比較的大量に投与せねばならないと言う課題があった。従って、本発明が解決しようとする課題乃至発明の本質的な目的は、自体周知の遺伝子組換え技術を用いて大量生産が可能であり且つ生物学的活性が *in vivo* において強力であり、斯くて所要投与量を抑制し得るようになること、即ち VIP アナログを有効成分とする医薬品を殊に気管支拡張剤、インホテンツ治療剤等として実用化する途を開くことにある。

【0008】本発明の 1 特定目的は生物学的活性が強力な VIP アナログ調製用の融合蛋白を提供することにある。本発明の他の特定目的は、該融合蛋白から VIP アナログを調製する方法を提供することにある。本発明の更に他の特定目的は VIP アナログ発現用の遺伝子組換えプラスミド及び当該プラスミドにより形質転換された微生物を提供することにある。

【0009】

【課題を解決し、目的を達成する手段及び作用】既述の課題を解決し且つ上記の目的を達成するために、本発明者等は更に検討した結果、適切なリーダーペプチドを選択し、[Leu¹⁷]-VIP-Met を該リーダーペプチドの下流に、好ましくは複数個タンデムに連結したペプチドに対応する組換え DNA を発現用プラスミドに組み込み、この遺伝子組換えプラスミドを宿主である微生物に移入し、当該形質転換微生物を培養することにより封入体 (インクルージョン・ボディ) としての融合蛋白を形成させ、次いで臭化シアン処理により該融合蛋白を個々の VIP アナログに分離させることにより強力な生物学的活性を有する [Leu¹⁷]-VIP-Hse (Hse-ラクトンを含む) を大量に製造できることを見出し、これによって本発明を完成するに至った。

【0010】従って、本発明によれば、ザルコファーガレクチンの一部であって分子量が 5000 以上の部位をリーダーペプチドとしており、該リーダーペプチドの下流

(4)

特開平6-306100

5

6

に一般式 (1) (配列番号 1 に相当)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr- R_1 - R_2 -Tyr-Thr- R_3 -
 -Leu-Arg-Lys-Gln-Leu-Ala- R_4 - R_5 -Lys-Tyr-Leu- R_6 -
 - R_7 - R_8 - R_9 - R_{10} -Met

(式中 R_1 は Asp 又は Gly を意味し、 R_2 は Asn 又は Gln を意味し、 R_3 は Arg 又は Lys を意味し、 R_4 は Val, Ala 又は Lys を意味し、 R_5 は Lys 又は Leu を意味し、 R_6 は Asn, Gln 又は Lys を意味し、 R_7 は Ser, Lys 又は Ala を意味し、 R_8 は Ile, Ala 又は Leu を意味し、 R_9 は Leu 又は Lys を意味し、 R_{10} は Asn, Lys 又は Arg を意味する)にて示されるペプチドが単数又は複数分子タンデムに連結した状態をなしているVIP アナログ調製用融合蛋白により上記の第 1 特定目的が達成される。

【0011】リーダーペプチドは、上記の一般式 (1) にて示されるペプチドが封入体としての融合蛋白を安定にしておくために付属させたものであり、その分子量が 5000 以上と規定されているのは、分子量がそれ以下であると融合蛋白の発現しないことが判明したためであり、上限値に格別の制限はないが、分子量が高過ぎると形成された融合蛋白の内でリーダーペプチドの占める割合が相対的に多くなるので好ましくない (リーダーペプチド領域は不要物となるため)。上記の一般式 (1) にて示されるペプチドの内、 R_1 が Gly であり、 R_2 が Asn であり、 R_3 が Lys であり、 R_4 が Ala であり、 R_5 が Lys であり、 R_6 が Asn 又は Lys であり、 R_7 が Lys 又は Ala であり、 R_8 が Ala 又は Leu であり、 R_9 が Leu 又は Lys であり、 R_{10} が Lys 又は Arg であるペプチドが有利であり、特に His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Leu-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Met (配列番号 3)、即ち [Leu⁷]VIP-Met 分子であるのが有利である。一般式 (1) にて示されるペプチド分子がタンデム *

＊に連結される分子数にも格別の制限はないが、連結のための作業に要する手間、試薬、所要時間等を考慮に入れると、1 - 10 分子程度であり、全固体蛋白に対する融合蛋白の置割合は 4 分子連結させた場合が最も高いので好ましい。2 - 3 分子及び 5 - 10 分子連結させた場合の融合蛋白の置割合は何れも同程度であり、4 分子連結させた場合と比較すると遥かに少ない。

【0012】一般式 (2) (配列番号 2 に相当)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr- R_1 - R_2 -Tyr-Thr- R_3 -
 -Leu-Arg-Lys-Gln-Leu-Ala- R_4 - R_5 -Lys-Tyr-Leu- R_6 -
 - R_7 - R_8 - R_9 - R_{10} -Hse

(式中 R_1 - R_{10} は前記の意味を有し、Hse はホモセリン又はホモセリン・ラクトン残基を意味する)にて示される VIP アナログは上記の融合蛋白を臭化シアンで処理することにより調製することができる。

【0013】遺伝子組換えプラスミドは上記のリーダーペプチドの下流に上記の一般式 (2)にて示されるペプチドが単数又は複数分子タンデムに連結されたポリペプチドを用いる以外に自体周知の手法で調製することができる。形質転換微生物は該遺伝子組換えプラスミドを自体周知の手法にて組み込むことにより得ることができる。尚、微生物としては大腸菌である E. coli JM109, HB101 株等を用いることができる。

【0014】

【実施例等】次に、VIP アナログの製造例及び生理活性試験例を掲げ、これにより本発明を更に詳細に且つ具体的に説明する。尚、下記の製造例は専ら [Leu⁷]VIP-Hse (ホモセリン・ラクトンを含む) の調製に関するものであるが、本発明の範疇に属する VIP アナログはその遺伝子部分が合成品であるので、同様にして調製することができる。

【0015】製造例

a) 工程 1 : [Leu⁷]VIP-Met の合成 (図 1 をも参照)

5 10 15
 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-
 20 25 29
 Gln-Leu-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Met

上記のポリペプチド (配列番号 3) を調製するために、*二本鎖 DNA 断片 (配列番号 4) を製造した。
 下記の式 (3) にて示されるヌクレオチド配列を有する *

式 (3)

1 10 20 30 40 50 60
 5'-GATCTTCATGCATTGAGATGCAGTGTTCAGTACAACTACACCGGCTGGGCAACAGCT
 3'- AAGTACGTAAGTCTACGTCACAAGTCACTGTTGATGTGGCGGACGGCGTTTGTGGA
 70 80 90 100 110
 GGCTGTAAAGAAATACCTGAACCTCAATATTGAACATGGGATCCTGTGATA
 CGGACATTTCCTTATGGACTTGAGTTATAACTTGTACCGCTAGGACACTATTGGA

上記の式 (3) にて示される二本鎖 DNA は、次のようにして調製された。ファルマシア社製の DNA 合成装置である「ジーンアセンブラ」を用いて、先ず、下記の式 (4) - (11) にて示されるヌクレオチド配列を有する一

本鎖 DNA をそれぞれ合成した。これらの一本鎖 DNA において式 (4) と (8)、(5) と (9)、(6) と (10) 及び (7) と (11) は、末端の一部分を除き互いに相補的なものであり、従って二本鎖 DNA を形成することができ

る。

式 (4) (配列番号 5)

5'-GATCTTCATGCATTCAGATGCAGTGT

式 (5) (配列番号 6)

5'-CACTGACAACACACGCCGCTGGGCAAA

式 (6) (配列番号 7)

5'-CAGCTGGCTGTAAAGAAATACCTGAAC

式 (7) (配列番号 8)

5'-CAATATTGAACATGGGGATCCTGTGATA

式 (8) (配列番号 9)

5'-TCAGTGAACACATGCATCTGAATGCATGAA

式 (9) (配列番号 10)

5'-CCAGCTGTTTGGCGACGGCGGTGATGTTG

式 (10) (配列番号 11)

5'-ATATTGAGTTCAGGATATTTCTTTACAG

式 (11) (配列番号 12)

5'-AGCTTATCAGCAGATCGGCATGTTCA

上記の式 (4) - (11) にて示される一本鎖 DNA をポリヌクレオチドキナーゼによりそれぞれ処理して 5' 末端をリン酸化した後に、相補的な DNA 対である式 (4) と (8)、(5) と (9)、(6) と (10) 及び (7) と (11) にて示される一本鎖 DNA をそれぞれアニールさせて形成された 4 本の二本鎖 DNA を DNA リガーゼにより処理してタンデムに接合することにより式 (3) にて示される二本鎖 DNA 断片 (配列番号 4) を得た。この合成 DNA は、Ile-Phe-Met に続いて [Leu^{3'}]-VIP-Met-Gly-Ile-Leu をコードしている。

【0016】b) 工程 2: [Leu^{3'}]-VIP-Met をコードする DNA のベクターへの組込みと [Leu^{3'}]-VIP-Met 分子部分の複数化

工程 1 において得られた合成 DNA 断片を発現用ベクターに組み込む操作方法について、図 1 を参照しつつ説明する。特開平 3-80096 に記載のプラスミド (pTKH4 - これは [Leu^{3'}]-モチリン-Met をコードする DNA 分子が 4 分子タンデムに連結されたものを有しているプラスミドであり、この遺伝子組換えプラスミドにて大腸菌 (HB101 株) を形質転換した形質変換体は国際寄託されている (発明番号第 2555 号) を制限酵素 BglII と HndIII とを用いて切断し、大きな方のフラグメントを精製した。これを式 (3) にて示される DNA 断片 (配列番号 4) と接合してプラスミドを再構築した。このプラスミドを pQ6VH1 と命名した。次に、[Leu^{3'}]-VIP-Met 分子を複数個タンデムに連結する方法について図 2 を参照しつつ説明する。プラスミド pQ6VH1 を制限酵素 PstI と BglIII を用いて切断し、[Leu^{3'}]-VIP-Met を含む方の DNA 断片を精製した (DNA I)。これとは別に pQ6VH1 を制限酵素 PstI と BamHI とを用いて切断し、[Leu^{3'}]-VIP-Met を含む方の DNA 断片を精製した (DNA II)。DNA I と DNA II とを連結してプラスミドを再構築し、[Leu^{3'}]-VIP-Met 2 分子がタンデムに連結さ

(5)

特開平 6-306100

8

れたプラスミド pQ6VH2 を得た。尚、この場合に制限酵素 BglIII と BamHI とによる断点が DNA リガーゼにより接合されるが、この接合部位はこれら両酵素の認識部位ではなくなってしまう。従って、上記の切断および接合操作を繰り返すことにより [Leu^{3'}]-VIP-Met が任意の個数タンデムに連結されたプラスミドを得ることができ、このようにして [Leu^{3'}]-VIP-Met が 3-10 分子タンデムに連結されたプラスミドである pQ6VH3、pQ6VH4、pQ6VH5、pQ6VH6、pQ6VH7、pQ6VH8、pQ6VH9 及び pQ6VH10 をそれぞれ得た。

【0017】c) 工程 3: リーダーペプチドであるザルコファールゲレクチンのベクターへの組込み

工程 2 により得られた遺伝子組換えプラスミドに、リーダーペプチドとしてのザルコファールゲレクチンを見込導入する方法について図 3 を参照しつつ説明する。ザルコファールゲレクチン ["J. Biological Chemistry", Vol. 260, pages 12228-12233 (1985)] の発現に用いるプラスミド (pTA160-12) を制限酵素 EcoRI と ScaI とを用いて切断し、DNA 断片を得た。この DNA 断片に宝酒造株式会社製のプランティングキットを用いて平滑末端処理を施した (この DNA 断片を DNA III とする)。一方、プラスミド pQ6VH1 を制限酵素 ScaI と BglIII で切断した後、上記と同様に平滑末端処理して DNA IV を得た。DNA III と DNA IV とを DNA リガーゼで連結することによりザルコファールゲレクチンの 24 番目から 265 番目のアミノ酸残基を有するポリペプチドに [Leu^{3'}]-VIP-Met が 1 分子結合したポリペプチドをコードする DNA を含むプラスミド pTLVH1 を作製した。更に、pQ6VH2、pQ6VH3、pQ6VH4、pQ6VH5、pQ6VH6、pQ6VH7、pQ6VH8、pQ6VH9 及び pQ6VH10 についても同様の処理、即ち制限酵素 ScaI と BglIII を用いて切断した後、平滑末端処理した DNA 断片を各々 DNA III と連結することにより、ザルコファールゲレクチンの 24 番目から 265 番目のアミノ酸残基を有するポリペプチドに [Leu^{3'}]-VIP-Met が 2-10 分子タンデムに連結したポリペプチドをコードする DNA を含むプラスミド pTLVH2、pTLVH3、pTLVH4、pTLVH5、pTLVH6、pTLVH7、pTLVH8、pTLVH9 及び pTLVH10 を得た。

【0018】d) 工程 4: 融合蛋白発現用プラスミドの作製

次に、融合蛋白発現用プラスミドの構築について図 4 を参照しつつ説明する。ファルマシア社製のプラスミド pKK223-3 を制限酵素 EcoRI と HndIII とを用いて切断して DNA V を得た。尚、このプラスミド pKK223-3 は、tac プロモータを有しており、外来性遺伝子にコードされた蛋白をイソプロピル- β -D-ガラクトシド (IPTG) によって発現することができるプラスミドベクターである。一方、pTLVH1 を制限酵素 EcoRI と HndIII とを用いて切断した後 VIP アナログをコードする方の DNA V と接合することにより、tac プロモータに

(6)

特開平6-306100

9

10

続いて、ザルコファーガレクチンの 24 番目から 265 番目のアミノ酸残基を有するポリペプチドに [Leu¹⁷]-VIP-Met が 1 分子結合したポリペプチドをコードする発現用プラスミド pILVH1 を得た。プラスミド pILVH2, pILVH3, pILVH4, pILVH5, pILVH6, pILVH7, pILVH8, pILVH9 及び pILVH10 についても同様の処理、即ち制限酵素である EcoRI と HindIII とを用いて切断した後に VIP アナログをコードする方の DNA を単離し、DNA V と接合することにより、tac プロモータに引き続いて、ザルコファーガレクチンの 24 番目から 265 番目のアミノ酸残基を有するポリペプチドに [Leu¹⁷]-VIP-Met が 2 - 10 分子タンデムに連結したポリペプチドをコードする発現用プラスミドである pILVH2, pILVH3, pILVH4, pILVH5, pILVH6, pILVH7, pILVH8, pILVH9 及び pILVH10 を得た。

【0019】e) 工程 5 : リーダーペプチドとしてのザルコファーガレクチンの削り込み

[Leu¹⁷]-VIP-Hse を多量に得るためには、融合蛋白として発現される蛋白の内、[Leu¹⁷]-VIP-Met の占める割合を高くさせると共に、融合蛋白の発現量が多いプラスミドを選択するのが望ましい。そこで、リーダーペプチドとしてのザルコファーガレクチン部分の削り込みを複製連鎖反応法により行なった。この方法について図 5 を参照しつつ説明する。複製連鎖反応法を行なうためのプライマーとして pKK223-3 の 39 - 55 番目のヌクレオチド配列に相当する DNA (DNA VI, 配列番号 13)、ザルコファーガレクチンをコードする DNA の内で 162 - 178 番目のヌクレオチドに相当する DNA に制限酵素 BglII を認識するヌクレオチド配列を付加した DNA のアンチセンス DNA (DNA VII, 配列番号 14)、ザルコファーガレクチンをコードする DNA の内で 288 - 304 番目のヌクレオチド配列に相当する DNA に制限酵素 BglIII を認識するヌクレオチド配列を付加した DNA のアンチセンス DNA (DNA VIII, 配列番号 15) 及びザルコファーガレクチンをコードする DNA の内で 496 - 513 番目のヌクレオチド配列に相当する DNA に制限酵素 BglIII を認識するヌクレオチド配列を付加した DNA のアンチセンス DNA (DNA IX, 配列番号 16) 及びザルコファーガレクチンをコードする DNA の内で 135 - 151 番目のヌクレオチド配列に相当する DNA に制限酵素 BglIII を認識するヌクレオチド配列を付加した DNA のアンチセンス DNA (DNA XIII, 配列番号 17) を合成した。

DNA VI (配列番号 13) :

5'-GCTCGTATAATGTGG-3'

DNA VII (配列番号 14) :

5'-CCAGATCTGTTGTTGATCATGGGG-3'

DNA VIII (配列番号 15) :

5'-CCAGATCTGCCATAGTCAGGACTT-3'

DNA IX (配列番号 16) :

5'-CCAGATCTTGAGTGCTTGATCATA-3'

DNA XIII (配列番号 17) :

5'-CCAGATCTGCCAGGCTTGATGCCAA

鑄型 DNA として pILVH1 を、プライマー DNA として DNA VI (配列番号 13) と DNA VII (配列番号 14) とを添加して複製連鎖反応法を行った。反応後の溶液から、産物 DNA を単離した後に、制限酵素 EcoRI と BglIII とを用いて切断し、DNA X を単離した。この DNA X は、ザルコファーガレクチンの 24 - 59 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドをコードしている。一方、pILVH1 を制限酵素 EcoRI と BglIII とで切断した後に、VIP アナログをコードする方の DNA を単離し、DNA X と連結することにより、ザルコファーガレクチンの 24 - 59 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドに [Leu¹⁷]-VIP-Met が 1 分子連結したポリペプチドをコードする発現用プラスミド pIL162VH1 を得た。尚、プラスミド pILVH2, pILVH3, pILVH4, pILVH5, pILVH6, pILVH7, pILVH8, pILVH9 及び pILVH10 についても同様の処理、即ち制限酵素 EcoRI と BglIII とを用いて切断した後に、VIP アナログをコードする方の DNA を単離し、DNA X と連結することにより、tac プロモータに引き続いて、ザルコファーガレクチンの 24 - 59 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドに [Leu¹⁷]-VIP-Met が 2 - 10 分子タンデムに連結したプラスミドである pIL162VH2, pIL162VH3, pIL162VH4, pIL162VH5, pIL162VH6, pIL162VH7, pIL162VH8, pIL162VH9 及び pIL162VH10 を得た。次に、鑄型 DNA として pILVH1, プライマー DNA として DNA VI (配列番号 13) と DNA VIII (配列番号 15) を添加して複製連鎖反応法を行った。反応後の溶液から、産物 DNA を単離した後、制限酵素 EcoRI と BglIII とを用いて切断し、DNA XI を単離した。この DNA XI は、ザルコファーガレクチンの 24 - 101 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドをコードしている。一方、pILVH1 を制限酵素 EcoRI と BglIII とで切断した後に、VIP アナログをコードする方の DNA を単離し、DNA XI と連結することにより、ザルコファーガレクチンの 24 - 101 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドに [Leu¹⁷]-VIP-Met が 1 分子連結したポリペプチドをコードする発現用プラスミド pIL288VH1 を得た。尚、プラスミド pILVH2, pILVH3, pILVH4, pILVH5, pILVH6, pILVH7, pILVH8, pILVH9 及び pILVH10 についても同様の処理、即ち制限酵素 EcoRI と BglIII とを用いて切断した後に、VIP アナログをコードする方の DNA を単離し、DNA XI と接合することにより、tac プロモータに引き続いて、ザルコファーガレクチンの 24 - 101 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドに [Leu¹⁷]-VIP-Met が 2 - 10 分子タンデムに連結したポリペプチドをコードするプラスミドである pIL288VH2, pIL288VH3, pIL288VH4, pIL288VH5, pIL288VH6, pIL288VH7, pIL288VH8, pIL288VH9 及び pIL288VH10 を得た。更に、鑄型 DNA として pILVH1, プライマー DNA として D

11

NA VI (配列番号13) と DNA IX (配列番号 16) とを添加して複製連鎖反応を行った。反応後の溶液から、産物 DNA を単離した後に、制限酵素 EcoRI と BqIII とで切断し、DNA XII を単離した。この DNA XII はザルコファーガレクチンの 24 - 171 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドをコードしている。一方、pILVH1 を制限酵素 EcoRI と BqIII とで切断した後に、VIP アナログをコードする方の DNA を単離し、DNA XII と連結することにより、ザルコファーガレクチンの 24 - から 171 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドに [Leu⁺]-VIP-Met が 1 分子連結したポリペプチドをコードする発現用プラスミド pIL496VH1 を得た。尚、プラスミド pILVH2, pILVH3, pILVH4, pILVH5, pILVH6, pILVH7, pILVH8, pILVH9 及び pILVH10 についても同様の処理、即ち制限酵素 EcoRI と BqIII とを用いて切断した後に、VIP アナログをコードする方の DNA を単離し、DNA XII と連結することにより、tac プロモータに引き続いて、ザルコファーガレクチンの 24 - 171 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドに [Leu⁺]-VIP-Met が 2 - 10 分子タンデムに連結したポリペプチドをコードするプラスミド pIL496VH2, pIL496VH3, pIL496VH4, pIL496VH5, pIL496VH6, pIL496VH7, pIL496VH8, pIL496VH9 及び pIL496VH10 を得た。更に、鋳型 DNA として pILVH1, プライマー DNA として DNA VI (配列番号13) 及び DNA XIII (配列番号 17) を添加し、複製連鎖反応を行った。反応後の溶液から産物 DNA を単離した後、制限酵素 EcoRI と BqIII により切断し、DNA XIV を単離した。この DNA XIV は、ザルコファーガレクチンの 24 - 50 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドをコードしている。一方、pILVH1 を制限酵素 EcoRI と BqIII とで切断した後に、VIP アナログをコードする方の DNA を単離し、DNA XIV と連結することにより、ザルコファーガレクチンの 24 - から 50 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドに [Leu⁺]-VIP-Met が 1 分子連結したポリペプチドをコードする発現用プラスミド pIL135VH1 を得た。尚、プラスミド pILVH2, pILVH3, pILVH4, pILVH5, pILVH6, pILVH7, pILVH8, pILVH9 及び pILVH10 についても同様の処理、即ち制限酵素 EcoRI と BqIII とを用いて切断した後に、VIP アナログをコードする方の DNA を単離し、DNA XIV と連結することにより、tac プロモータに引き続いて、ザルコファーガレクチンの 24 - 50 番目のアミノ酸残基に相当するポリペプチドに [Leu⁺]-VIP-Met が 2 - 10 分子タンデムに連結したポリペプチドをコードするプラスミドである pIL135VH2, pIL135VH3, pIL135VH4, pIL135VH5, pIL135VH6, pIL135VH7, pIL135VH8, pIL135VH9 及び pIL135VH10 を得た。

【0020】f) 工程 6 : 融合蛋白の産生

工程 2 において得られたプラスミド pQ6VH1, pQ6VH2, pQ6VH3, pQ6VH4, pQ6VH5, pQ6VH6, pQ6VH7, pQ6VH8, pQ

(7)

特開平6-306100

12

6VH9 及び pQ6VH10 の各々を大腸菌 (JM109 株) に取り込ませて形質転換菌を得た。これらの形質転換菌をアンピシリン 50μg/ml 含有培養液により 25 - 40℃ で通気培養し、A₆₀₀ が 0.4 - 5.0 となった時点で IPTG を最終濃度が 1mM となるように添加した。その後に 5 - 24 時間培養を継続し、遠心分離 (5000rpm, 4℃, 20 分間) により菌体を回収した。これらの菌体の一部を分取して 12.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した処、該当する部分には目的とする蛋白のバンドは微量しか確認されなかった。これらのバンドをデンストメータにより測定した処、何れの蛋白も全蛋白の 1% 以下の発現量であった。工程 5 において得られた融合蛋白発現用プラスミドである pILVH1, pILVH2, pILVH3, pILVH4, pILVH5, pILVH6, pILVH7, pILVH8, pILVH9, pILVH10, pIL135VH1, pIL135VH2, pIL135VH3, pIL135VH4, pIL135VH5, pIL135VH6, pIL135VH7, pIL135VH8, pIL135VH9 及び pIL135VH10, pIL162VH1, pIL162VH2, pIL162VH3, pIL162VH4, pIL162VH5, pIL162VH6, pIL162VH7, pIL162VH8, pIL162VH9, pIL162VH10, pIL288VH1, pIL288VH2, pIL288VH3, pIL288VH4, pIL288VH5, pIL288VH6, pIL288VH7, pIL288VH8, pIL288VH9, pIL288VH10, pIL496VH1, pIL496VH2, pIL496VH3, pIL496VH4, pIL496VH5, pIL496VH6, pIL496VH7, pIL496VH8, pIL496VH9 及び pIL496VH10 の各々を大腸菌 (JM109株) に取り込ませて形質転換菌を得た。これらの形質転換された大腸菌のうち pIL496VH1 を取り込ませた菌については、工業技術院微生物工業技術研究所に国内寄託された [微工研菌寄第 13447 号 (FERM P-13447)]。これらの形質転換菌をアンピシリン 50μg/ml 含有培養液 (例えば L-培地、アミノ酸含有 M9 培地等) により且つエイブル社製の D 型フューメンターを用いて 25 - 40℃ (好ましくは 30 - 38℃の間) で通気培養した。A₆₀₀ が、0.4 - 5.0 (好ましくは 0.6 - 0.8) となった時点で IPTG を最終濃度が 1mM となるように添加した。その後、5 - 24 時間培養を継続し、次いで遠心分離法 (5000rpm, 4℃, 20 分間) により菌体を回収した。これらの菌体の一部を分取して 12.5% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した処、目的とする融合蛋白の分子量に相当する位置にバンドが確認された。これらのバンドをデンストメータにより測定した処、目的とする融合蛋白の発現量は、下記の表 1 に示される通りであった。尚、リーダーペプチドとしてザルコファーガレクチンの 24 - 50 番目のアミノ酸残基を有する遺伝子組換えプラスミド (pIL135VH1 - pIL135VH10) を用いて形質転換させた大腸菌には融合蛋白の発現が認められず、従ってこれらは表 1 から除外されている。一方、ザルコファーガレクチンの 24 - 59 番目のアミノ酸残基をリーダーペプチドとして有している遺伝子組換えプラスミド (pIL162VH1 - pIL162VH10) を用いて形質転換させた大腸菌には融合蛋白の発現が認められたので、ザルコファーガレクチンの一部を

(8)

特開平6-306100

13

14

リーダーペプチドとして用いる場合に、その分子量は 5000 以上のものとする必要があると推定された。
この表 1 に示される結果から、[Leu¹⁷]-VIP-Met が 4 分子タンデムに連結したものをを用いるのが殊に有利であ *

ることが判る。
【0021】
【表 1】

プラスミド	全菌体蛋白に対する 融合蛋白の割合 (%)	プラスミド	全菌体蛋白に対する 融合蛋白の割合 (%)
pILVH1	<2	pIL288VH1	<2
pILVH2	<2	pIL288VH2	<2
pILVH3	<2	pIL288VH3	<2
pILVH4	1.5	pIL288VH4	1.3
pILVH5	<2	pIL288VH5	<2
pILVH6	<2	pIL288VH6	<2
pILVH7	<2	pIL288VH7	<2
pILVH8	<2	pIL288VH8	<2
pILVH9	<2	pIL288VH9	<2
pILVH10	<2	pIL288VH10	<2
pIL162VH1	<2	pIL496VH1	<2
pIL162VH2	<2	pIL496VH2	<2
pIL162VH3	<2	pIL496VH3	<2
pIL162VH4	1.0	pIL496VH4	2.5
pIL162VH5	<2	pIL496VH5	<2
pIL162VH6	<2	pIL496VH6	<2
pIL162VH7	<2	pIL496VH7	<2
pIL162VH8	<2	pIL496VH8	<2
pIL162VH9	<2	pIL496VH9	<2
pIL162VH10	<2	pIL496VH10	<2

【0022】a) 工程 7: [Leu¹⁷]-VIP-Hse の分離精製
既述の工程 5 において得た遺伝子組換えプラスミド pIL496VH1 により形質転換させた大腸菌を培養し、IPTG により融合蛋白を産生させた大腸菌 (工程 6 参照) の菌体沈殿物 (培地 300ml に相当) に精製水 8ml を添加して懸濁させ、超音波装置を用いて菌体に破壊処理を施した。遠心分離法 (5000 rpm, 4°C, 15 分間) により [Leu¹⁷]-VIP-Met を包含する封入体を含む沈殿部分を回収し、70% 塩酸 40ml を加えて沈殿を溶解させた後に臭化シアニ 0.1g を添加し、30°C にて 16 時間反応させた。反応終了後、160 ml の精製水を加えて遠心分離 (5000 rpm, 4°C, 15 分間) し、上清を凍結乾燥することにより [Leu¹⁷]-VIP-Hse を含有する凍結乾燥粉末を得た。これに 10% 酢酸溶液 10 ml を添加して溶解させ、ウォーターズ社製の μ -ボンドスフェアの C-18 カラム (19mm x 15cm) を用い液体クロマトグラフィーにより [Leu¹⁷]-VIP-Hse を精製した。

精製条件:

溶出液: 0.012 規定塩酸 (15% から 50% までのアセトニトリルの直線勾配, 30 分間)、
流速: 2.0 ml/min、

【0022】a) 工程 7: [Leu¹⁷]-VIP-Hse の分離精製
既述の工程 5 において得た遺伝子組換えプラスミド pIL496VH1 により形質転換させた大腸菌を培養し、IPTG により融合蛋白を産生させた大腸菌 (工程 6 参照) の菌体沈殿物 (培地 300ml に相当) に精製水 8ml を添加して懸濁させ、超音波装置を用いて菌体に破壊処理を施した。遠心分離法 (5000 rpm, 4°C, 15 分間) により [Leu¹⁷]-VIP-Met を包含する封入体を含む沈殿部分を回収し、70% 塩酸 40ml を加えて沈殿を溶解させた後に臭化シアニ 0.1g を添加し、30°C にて 16 時間反応させた。反応終了後、160 ml の精製水を加えて遠心分離 (5000 rpm, 4°C, 15 分間) し、上清を凍結乾燥することにより [Leu¹⁷]-VIP-Hse を含有する凍結乾燥粉末を得た。これに 10% 酢酸溶液 10 ml を添加して溶解させ、ウォーターズ社製の μ -ボンドスフェアの C-18 カラム (19mm x 15cm) を用い液体クロマトグラフィーにより [Leu¹⁷]-VIP-Hse を精製した。

【0023】生理活性試験例

上記の方法により得られた [Leu¹⁷]-VIP-Hse を被験物質とし、天然型 VIP を対照物質として、コンツェット-レスラー (Konzett-Roessler) 法によりモルモットを用いた試験 ("J. Biol. Chem.", Vol. 256, pages 6389 - 6392, (1991)) を行った。この実験は、被験物質がヒスタミンによる気道収縮を阻害する活性を確認するためのものであり、結果は図 6 に示されている通りであった。本発明者等は以前に化学合成によって得た [Leu¹⁷]-VIP-Hse が、モルモット気管支平滑筋を用いた試験により、天然型 VIP に比べて 3 倍以上の活性を有することを報告しているが (特開平 4 - 230400)、本試験にお

(9)	特開平6-306100
<p>15</p> <p>いてもこの事実が裏付けられた。</p>	<p>16</p> <p>＊の構造の VIP アナログとして大量に且つ廉価に市場へ供給し得ることを意味している。</p>
<p>【0024】</p>	<p>【配列表】</p>
<p>【発明の効果】本発明によれば、天然型 VIP と比較する場合に数倍の活性を有し且つ安定性の高い、[Leu¹⁷]-VIP-Hse が形質転換大腸菌を用いて容易に且つ大量に製造することができる。このことは、気管支喘息やインボテンツの治療に使用することが期待されながら、大量に得ることができないために、或は活性が比較的低いために利用されてこなかった VIP や VIP アナログが、上記＊</p>	<p>配列番号 : 1</p> <p>配列の長さ : 29</p> <p>配列の型 : アミノ酸</p> <p>トポロジー : 直線状</p> <p>配列の種類 : ペプチド</p>
<p>配列</p> <p>His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Xaa-Xaa-Tyr-Thr-Xaa-Leu-Arg-Lys-</p> <p>1 5 10 15</p> <p>Gln-Leu-Ala-Xaa-Xaa-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Met</p> <p>20 25</p>	<p>※トポロジー : 直線状</p> <p>配列の種類 : ペプチド</p>
<p>配列番号 : 2</p> <p>配列の長さ : 29</p> <p>配列の型 : アミノ酸</p>	<p>※</p>
<p>配列</p> <p>His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gly-Asn-Tyr-Thr-Lys-Leu-Arg-Lys-</p> <p>1 5 10 15</p> <p>Gln-Leu-Ala-Ala-Lys-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa</p> <p>20 25</p>	<p>★トポロジー : 直線状</p> <p>配列の種類 : ペプチド</p>
<p>配列番号 : 3</p> <p>配列の長さ : 29</p> <p>配列の型 : アミノ酸</p>	<p>★</p>
<p>配列</p> <p>His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-</p> <p>1 5 10 15</p> <p>Gln-Leu-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-Met</p> <p>20 25</p>	<p>☆鎖の数 : 二本鎖</p> <p>トポロジー : 直線状</p>
<p>配列番号 : 4</p> <p>配列の長さ : 111</p> <p>配列の型 : 核酸</p>	<p>☆ 配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA</p>
<p>配列</p> <p>1 10 20 30 40 50 60</p> <p>GATCTTCATGCATTGAGATGCAGTGTTCAGTGCACAACTACAGCGGCTGGCGAAACAGCT</p> <p>AAGTACGTAAGTCTACGTCACAAGTGACTGTTGATGTGGCGGACGGGTTTGTGGA</p> <p>70 80 90 100 110</p> <p>GGCTGTAAAGAAATACCTGAACCTCAATATTGAACATGGCGATCCTGTGATA</p> <p>CGGACATTTCTTTATGGACTTGAGTTATAACTTGTACCGCTAGGACACTATTGGA</p>	<p>配列の長さ : 28</p> <p>配列の型 : 核酸</p> <p>鎖の数 : 一本鎖</p> <p>トポロジー : 直線状</p> <p>配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA</p>
<p>配列番号 : 5</p> <p>配列の長さ : 27</p> <p>配列の型 : 核酸</p> <p>鎖の数 : 一本鎖</p> <p>トポロジー : 直線状</p> <p>配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA</p>	<p>配列</p> <p>CACTGACAACTACAGCGGCTGGCGAAA</p> <p>1 10 20</p>
<p>配列</p> <p>GATCTTCATGCATTGAGATGCAGTGT</p> <p>1 10 20</p> <p>配列番号 : 6</p>	<p>配列番号 : 7</p> <p>配列の長さ : 28</p>

(11)

特開平6-306100

19

20

1 10 20

【図面の簡単な説明】

【図1】 [Leu⁺]-VIP-Met をコードする合成遺伝子をプラスミドに組み込む方法を示す説明図である。

【図2】 [Leu⁺]-VIP-Met をコードする合成遺伝子をプラスミド中で複製化する方法を示す説明図である。

【図3】 ギルコファーガレクチンの下流に [Leu⁺]-VIP-Met をコードする合成遺伝子を組み込む方法を示す説明図である。

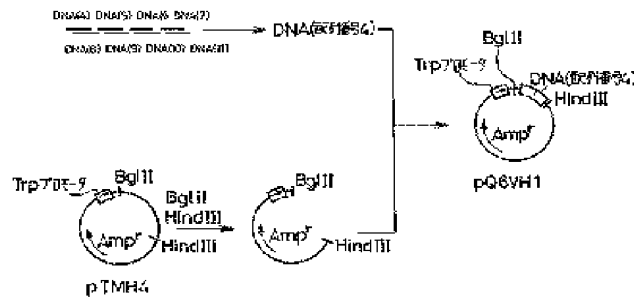
*

* 【図4】 ギルコファーガレクチンと [Leu⁺]-VIP-Met とをコードする遺伝子を tac プロモータの下流に連結する方法を示す説明図である。

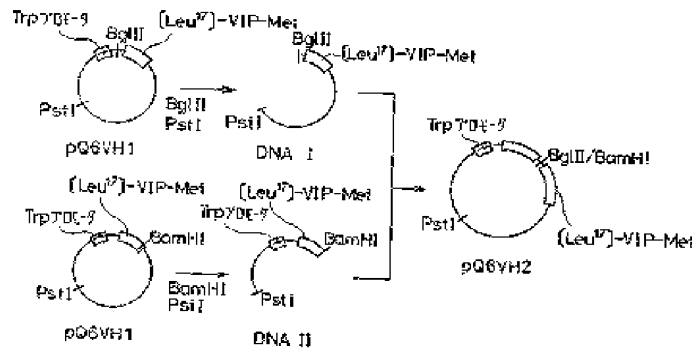
【図5】 複製連鎖反応法を用いてリーダーペプチドであるギルコファーガレクチンを削り込む方法を示す説明図である。

【図6】 [Leu⁺]-VIP-Hse がヒスタミンによる気管支収縮活性を阻害する作用を測定した結果を示すグラフである。

【図1】



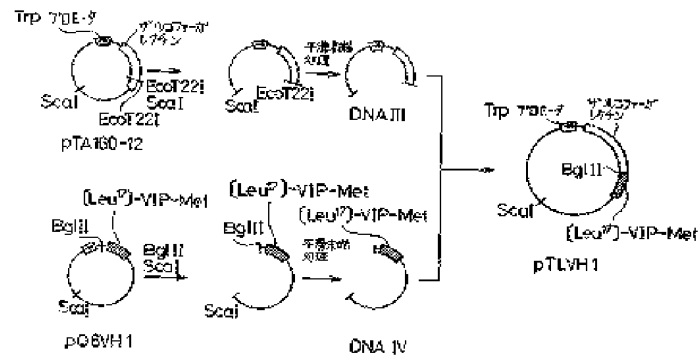
【図2】



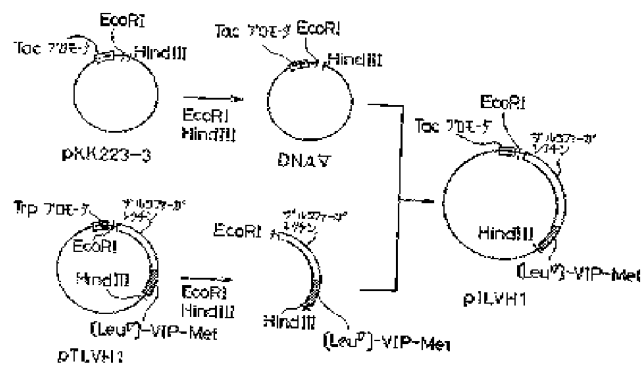
(12)

特開平6-306100

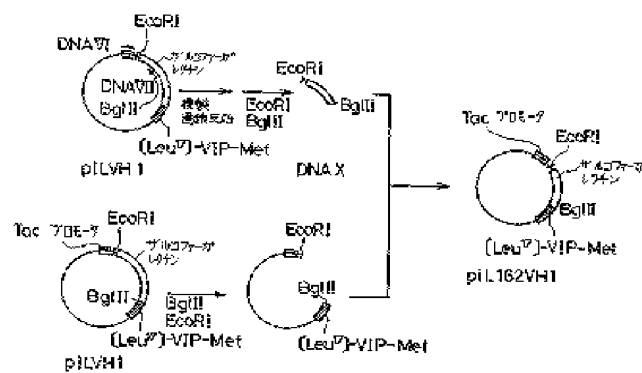
【図3】



【図4】



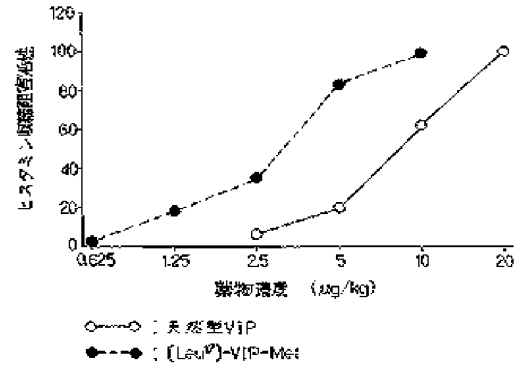
【図5】



(13)

特開平6-306100

【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所	
C 1 2 N 15/16					
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B			
/(C 1 2 N 1/21					
C 1 2 R 1:19)					
(C 1 2 P 21/02		C			
C 1 2 R 1:19)					
C 0 7 K 99:00					
(72)発明者 三谷 隆彦			(72)発明者 平出 欽也		
名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三			名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三		
和化学研究所内			和化学研究所内		
			(72)発明者 澤井 直一		
			名古屋市東区東外堀町35番地 株式会社三		
			和化学研究所内		